

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/051259 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 30/88, 30/06, 30/08, 30/46, 30/84, 33/50 区 本天沼 3 丁目 3 4-3 8-1 0 7 Tokyo (JP). 三田 真史 (MITA, Masashi) [JP/JP]; 〒104-8010 東京都 中央区 銀座 7 丁目 5 番 5 号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015478
- (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 3 日 (03.12.2003) (74) 代理人: 伊東 忠彦 (ITO, Tadahiko); 〒150-6032 東京都 渋谷区 恵比寿 4 丁目 2 0 番 3 号 恵比寿ガーデン プレイスタワー 3 2 階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-351677 2002 年 12 月 3 日 (03.12.2002) JP
特願2003-401940 2003 年 12 月 1 日 (01.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8010 東京都 中央区 銀座 7 丁目 5 番 5 号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CN, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本 順寛 (YAMAMOTO, Yorihiro) [JP/JP]; 〒167-0031 東京都 杉並
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ANALYZING COENZYME Q-10 AND TWO-ELECTRON REDUCTION PRODUCT THEREOF AND ANALYSIS SYSTEM

(54) 発明の名称: コエンザイム Q-10 およびその 2 電子還元体の分析方法ならびに分析システム

(57) Abstract: An analysis method and an analysis system whereby the contents of coenzyme Q-10 and its two-electron reduction product can be accurately analyzed. As a pretreatment, human plasma employed as a specimen is mixed with isopropyl alcohol and thus coenzyme Q-10 and its two-electron reduction product are extracted with isopropyl alcohol. The extract is stored at a temperature of 4°C until analyzing. Using the extract as a sample to be analyzed, analysis is carried out with the use of an analysis system having a liquid-transfer unit, a switching unit, a concentration column, a separation column, a reduction column, an ultraviolet absorption detector and an electrochemical detector.

(57) 要約: 本発明は、検体中のコエンザイム Q-10 とその 2 電子還元体の含有量を正確に分析することができる分析方法ならびに分析システムに関し、前処理として、検体としてのヒトの血漿をイソプロピルアルコールと混合し、コエンザイム Q-10 およびその 2 電子還元体をイソプロピルアルコールに抽出する。抽出液は分析するまでの間 4°C の温度で保管する。抽出液を分析試料として、送液機構、切り換え機構、濃縮カラム、分離カラム、還元カラム、紫外吸収検出器および電気化学検出器を備える分析システムで分析する。

WO 2004/051259 A1

明細書

コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システム

5 技術分野

本発明は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムに関する。

背景技術

- 10 コエンザイムQ（補酵素Q：CoQ）はベンゾキノン誘導体であり、広く生物界に存在することからユビキノンと命名されている。ユビキノンを2電子還元したヒドロキノン体がユビキノールである。

- ユビキノンは、化合物名が2,3-ジメチル-5-メチル-6-ポリプレニル-1,4-ベンゾキノンであり、イソプレニル単位が $n = 1 \sim 12$ の多数の同族体が天然に存在し、ヒト等の高等動物については $n = 10$ である。以下の説明では、特に断らない限り、ヒト等のユビキノンについてコエンザイムQ-10と表示するとともに、ヒト等のユビキノールについてコエンザイムQ-10の2電子還元体と表示する。
- 15

コエンザイムQ-10の2電子還元体は、強い抗酸化作用があり、活性酸素による細胞の損傷を防ぐ等老化防止に効果があるといわれている。

- 20 酸化ストレスは、生体内の酸化と抗酸化のバランスが崩れて酸化に傾いた、生体にとって好ましくない状態とされているが、コエンザイムQ-10とその2電子還元体の比率は、この酸化ストレスの度合いを反映していると考えられるので、酸化ストレスの良好なマーカーになりうるものと考えられている。

- このように、コエンザイムQ-10とその2電子還元体の挙動を知ることは非常に有用であるため、これらの成分を的確に分析する方法が求められる。
- 25

分析方法として、古典的なものとして紫外吸収法等があるが、第三物質の影響を受けやすく、煩雑な前処理を要する。

近年では、高感度で正確に分析できる方法として高速液体クロマトグラフィ（以下、HPLCと表示する。）が広く用いられている。コエンザイムQ-10の検出

には275 nmの紫外吸収が利用されている。しかしながら、従来のHPLCによる分析方法は、血漿中のコエンザイムQ-10を検出するためには感度が不十分である。

このため、コエンザイムQ-10を2電子還元体に還元して、還元前後の差を
5 コエンザイムQ-10として定量する方法も提案されている。ところが、この分析方法では、検体の前処理を行うとともに、HPLCへの試料注入を2度行う必要がある。

このため、本出願人は、図1に示すように、逆相の分離カラム（スぺルコ社製
LC-8）1でコエンザイムQ-10とその2電子還元体を分離した後、還元カ
10 ラム（資生堂製SHISEIDO CQ）2あるいはクーロメトリック電極を用いてコエンザイムQ-10を2電子還元体に還元して電気化学検出器3で測定する方法を、先に提案している（例えば、Satosi Yamasita and Yorihiro Yamamoto ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 250,66-73 (1997) 参照）。なお、図1中、参照符号4は移動相を、参照符号5はポンプを、参照符号6は試料注入器を、参照
15 符号7は保護カラムを、参照符号8は紫外吸収検出器を、それぞれ示す。

上記の分析方法を用いることにより、コエンザイムQ-10とその2電子還元体の高感度同時測定が可能である。得られるクロマトグラムの一例を図2に示す。図2中、「1」がコエンザイムQ-10のピークであり、「2」がコエンザイムQ-10の2電子還元体のピークである。

20 この場合、検体中の例えばビタミンCや尿酸等の水溶性抗酸化物質が測定に影響することから、検体をメタノール／ヘキサンで抽出処理し、水溶性抗酸化物質をメタノール相に、コエンザイムQ-10等をヘキサン相に分配する前処理を行っている。

しかしながら、上記のメタノール／ヘキサンで抽出処理する前処理方法は、ヘ
25 キサン抽出液中のコエンザイムQ-10が化学的に不安定であり、前処理後、処理液をHPLCに注入して分析するまでの間において、図3に示すように、かなりの率でコエンザイムQ-10の2電子還元体が酸化されてしまうために、検体抽出後、速やかに分析することが必要であった。正確な分析を行うためには、HPLCに注入する直前に抽出操作を行うことが必須であるため、大量の検体を一

括して処理することが極めて困難であった。なお、図3中、各温度はヘキサン抽出液の保管温度を示す。

発明の開示

- 5 本発明は、上述した従来技術の問題点を解決する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムを提供することを総括的な目的としている。

- 10 本発明のより詳細な目的は、検体中のコエンザイムQ-10とその2電子還元体の含有量を正確に定量することができる分析方法ならびに分析システムを実現することを目的とする。

この目的を達成するため、本出願人が鋭意検討した結果、前処理に用いる抽出溶剤としてメタノール／ヘキサンに変えてイソプロピルアルコールを用いることがより好適であることを見出し、この知見に基づいて以下の発明に至った。

- 15 本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法は、前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析することを特徴とする。

- 20 ここで、コエンザイムQ-10がユビキノンを指し、コエンザイムQ-10の2電子還元体がユビキノールを指すことは前記のとおりである。水溶性有機溶媒は、イソプロピルアルコールが好適であるが、これに限らず、イソプロピルアルコールと同等の極性を有する溶媒を用いることができ、例えば、メタノール、エタノール、ブタノールおよびn-プロピルアルコールを混合して極性を調整した混合溶媒等を用いることができる。なお、前処理後の分析試料を分析する方法は、
25 以下に説明する本発明の分析方法に限らず、前記した従来の分析方法等、適宜の方法を採用することもできる。

本発明の上記の構成により、分析試料の分析までの間の成分の変化を抑制することで正確に分析することができる。また、検体を抽出した後に直ちに分析を行う必要がない。

この場合、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室

温の範囲内の温度、より好ましくは4℃前後の温度で保管しておく、成分の変化をより確実に抑制することができて好適である。ここで、抽出液の融点は、抽出に用いる水溶性有機溶剤の融点と実質的に同じである。

また、この場合、前記分析試料（抽出液）をカラムスイッチング法により濃縮
5 する予備処理を行うと、分析試料のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の濃度が低い場合においても正確にかつ高感度で分析することができて、好適である。

また、この場合、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出すると、従来のようにHPLCに分析試料を2度注入する必要がなく、能率的に分析することができて好適である。

また、上記本発明の分析方法を好適に実現するために、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムは、コエンザイムQ-10
15 およびその2電子還元体の分析方法に用いる分析システムであって、分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動相のみを送液する第2系列とからなる送液機構と、該送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、該第1系列の移動相を受け入れて該分析試料を濃縮した後、該第2の移動相を受け入れる濃縮カラムと、該濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、該分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、該還元カラムから送り出された液を検出処理する電気化学検出器とを有することを特徴とする。

この場合、検出器としてさらに紫外吸収検出器を有すると、検体中のコレステロール等の電気化学検出では高感度で検出できない成分を同時分析することができて、好適である。

図面の簡単な説明

本発明の他の目的、特徴及び利点は添付の図面を参照しながら以下の詳細な説明を読むことにより一層明瞭となるであろう。

図1は、従来のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムの概略構成を示す図である。

図2は、図1の分析システムで得られるクロマトグラムの一例である。

図3Aは、コエンザイムQ-10の2電子還元体について、図1の分析システム
5の供試試料を保管したときの成分の経時変化を示すグラフ図である。

図3Bは、コエンザイムQ-10について、図1の分析システムの供試試料を保管したときの成分の経時変化を示すグラフ図である。

図4は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法における前処理工程を説明するための図である。

10 図5Aは、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の量について、本実施例に係る分析方法における前処理後の抽出液を保管するときの成分の経時変化を示すグラフ図である。

図5Bは、コエンザイムQ-10のモル分率について、本実施例に係る分析方法における前処理後の抽出液を保管するときの成分の経時変化を示すグラフ図で
15ある。

図6は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムの概略構成を示す図である。

図7は、検体として血漿を用いた場合において、図6の分析システムで得られるクロマトグラムの一例である。

20 図8は、検体として唾液を用いた場合において、図6の分析システムで得られるクロマトグラムの一例である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法
25ならびに分析システムの好適な実施の形態（以下、形態例という。）について、図を参照して説明する。

以下説明する第1の形態例においては、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を含む検体としてヒトの血漿を用いる。また、第2の形態例においては、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を含む検体としてヒトの唾液を用

いる。

まず、第1の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法における前処理について、図4を参照して説明する。

5 検体としてのヒトの血漿を50 μ l採取し(図4中、S-1)、これにイソプロピルアルコールを950 μ l加え(図4中、S-2)、十分に混合させる。ついで、4℃の温度下、12000rpmの回転速度で3分間、遠心機にかける。これにより、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体がイソプロピルアルコール相に抽出される(図4中S-3)。

そして、コエンザイムQ-10等を抽出した抽出液は、4℃前後の温度で保管
10 することにより(図4中、S-4)、図5に示すように、少なくとも11時間後においてもコエンザイムQ-10の2電子還元体が殆ど酸化を受けておらず、保管中の分析試料の変質を防止することができる。なお、図5(b)中、縦軸のコエンザイムQ-10は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の総量に占めるコエンザイムQ-10の比率(モル比)を表す。

15 以上説明した本実施に係る第1の形態例の前処理方法によれば、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を抽出した分析試料を長時間安定した状態で保管することができる。そして、この抽出液を分析試料とすることで、正確に分析することができる。また、このため、例えば、4℃に温度を制御したオートサンプラーに抽出液を分析試料としてセットすることで、大量の検体を連続
20 自動処理することができる。

なお、4℃という温度は、生体試料を検体とするときの通常取り扱い温度であり、この温度に生体試料を保つことにより、他の成分の変質も避けることができる。この温度を大きく超える温度で生体試料を取り扱うと、コエンザイムQ-10の2電子還元体をはじめとする成分の変質を避けることができず、一方、
25 生体試料を冷凍保管すると、分析に際して生体試料を解凍する手順が必要となり、また、上記したオートサンプラー等を用いた連続自動処理を容易に実現することができない。

したがって、本発明で言う4℃前後という温度は、上記した生体試料の取り扱いを可能とする限り、4℃よりも高い温度および4℃よりも低い温度の両方を含

む意である。すなわち、抽出液の保管温度は、抽出用の水溶性有機溶媒の融点乃至常温の範囲であってもよい。第1の形態例においては、抽出用の水溶性有機溶媒としてイソプロピルアルコールを用いるため、保管温度の下限值は、イソプロピルアルコールの融点である -89.5°C ということになる。

- 5 つぎに、上記の前処理を施し、所要時間保管した抽出液を分析試料として、HPLCで分析する方法について、以下説明する。

まず、図6を参照して、本実施に係る分析方法に用いる分析システムについて説明する。本実施に係る分析システム10は、送液機構12と、切り換え機構14と、濃縮カラム16と、分離カラム18と、還元カラム20と、電気化学検出器22と、紫外吸収検出器24とを備える。

送液機構12は、第1および第2の2系列で構成され、各系列は、それぞれ、移動相の貯留容器25a、25bと、貯留容器25a、25bの移動相を送液するポンプ26a、26bとを備える。第1系列には、試料注入器28をさらに備える。

- 15 第1系列の貯留容器25aには、移動相として、過塩素酸ナトリウム50mMを含むメタノールと水の混合溶液(メタノール95%水溶液)を貯留する。一方、第2系列の貯留容器25bには、移動相として、過塩素酸ナトリウム50mMを含むメタノールとイソプロピルアルコールの混合溶液(メタノール90%溶液)を貯留する。

- 20 ポンプ26a、26bは、例えば、いずれも、資生堂製のイナータポンプ3001を用いることができる。このイナータポンプ3001は、パルスモータによる定流量、定圧方式のデュアルピストンポンプであり、流量が $1\sim 3000\mu\text{l}/\text{min}$ 、吐出上限圧力35MPaである。

- 25 第1系列に設けられる試料注入器28は、第1系列の移動相に分析試料を同伴させるためのものであり、適宜の装置を用いることができるが、好適にはオートサンプラーを用いる。

試料注入器28としてオートサンプラーを用いる場合、例えば資生堂製のオートサンプラー3023を用いることができる。オートサンプラー3023は、試料注入量 $0.1\sim 400\mu\text{l}$ ($0.1\mu\text{l}$ 単位で制御可能)、試料処理数100～

200本であり、電子冷却により4～20℃の範囲内で温度を制御できる。

切り換え機構14は、送液機構12の2つの系列の移動相の送液経路を切り換えるためのものである。図6中、矢印A1のモード（以下モードA1という。）において、第1系列の移動相が濃縮カラム16に送られ、濃縮カラム16を出た、
5 コエンザイムQ-10等を取り除かれた液が排出される。

一方、第2系列の移動相が濃縮カラム16をバイパスして分離カラム18に直接送られる。これに対して、矢印A2のモード（以下、モードA2という。）において、第1系列の移動相が系外に排出されて濃縮カラム16への送液が停止されるとともに、第2系列の移動相が濃縮カラム16に送られ、濃縮された分析試料
10 を同伴した液（第2の移動相を主体とする液）が濃縮カラム16から分離カラム18に送られる。これにより、濃縮された分析試料が第2系列の移動相に同伴して分離カラム18に送られる。

切り換え機構14は、例えば切り換えバルブで構成され、このような切り換えバルブとしては、例えば、資生堂製の高圧切換六方バルブ3011を用いること
15 ができる。高圧切換六方バルブ3011は、SUS6ポート2ポジションバルブであり、耐圧が35MPaである。なお、この切り換え機構14で用いられる配管類をはじめとして分析システム10で用いられる配管類の接続関係は図6より明らかであり、また、配管材料については、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の吸着を防ぐために、SUSを用いる。

20 濃縮カラム16は、既に説明したように、例えば充填剤の吸着作用等を用いて分析試料を濃縮するためのものであり、例えばスペルコ社製のLC-8を用いることができる。

分離カラム18は、濃縮カラム16から送り出された液を分離するためのものであり、例えばスペルコ社製のLC-8を用いることができる。

25 還元カラム20は、分離カラムから送り出された液を還元するためのものであり、具体的には、分析試料中のコエンザイムQ-10をその2電子還元体に変換することを目的としたカラムである。還元カラム20は、例えば、資生堂製SHISEIDO CQを用いることができる。

電気化学検出器22は、電気化学的に高感度で検出することができるコエンザ

イムQ-10の2電子還元体を分析することを目的とするものであり、例えば資生堂製の電気化学検出器3005を用いることができる。電気化学検出器3005は、三極ポテンシオスタット方式であり、 $\pm 1990\text{ mV}$ の範囲内で 10 mV 単位で加電圧をデジタル設定することができる。

- 5 紫外吸収検出器24は、分析試料である血漿に含まれるコレステロール等の紫外線の吸収感度が高い成分を必要に応じて分析するためのものである。紫外吸収検出器22は、例えば、資生堂製のUV-VIS検出器3002を用いることができる。UV-VIS検出器3002は、ダブルビームシングルセル方式であり、波長範囲が $195\sim 700\text{ nm}$ である。

- 10 以上説明した本実施に係る分析システム10を用いた第1の形態例に係る分析方法を、つぎに説明する。

前記した前処理後の抽出液を分析試料として $40\text{ }\mu\text{l}$ 用意する。この $40\text{ }\mu\text{l}$ の分析試料中には、 $2.0\text{ }\mu\text{l}$ のヒトの血漿が含まれる。

- まず、切り換え機構14をモードA2にして、貯留容器25bに貯留した第2
15 系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16、分離カラム18および還元カラム20の各カラムに流して、各カラムを安定化させる。このとき、必要に応じて分離カラム18および還元カラム20へは、モードA1で送液してもよい。

- このカラムの安定化操作は、基本的に1度行えばよく、その後、複数の分析試
20 料を順次分析する場合においてもその都度上記の安定化操作を繰り返す必要はない。但し、カラムスイッチング法において、より安定した状態で処理することを目的として、切り換え機構14の切り換え前後を通じて第2系列の移動相を定常的に各カラムに送ってもよい。

- ついで、貯留容器25aに貯留した第1系列の移動相（メタノール95%水溶
25 液）をポンプ26aで、途中で試料注入器28によって上記の分析試料を同伴させて濃縮カラム16に送液する。このときの流速は $400\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ であり、ポンプ吐出圧は 1 MPa である。濃縮カラム16では分析試料中のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体等の主要な成分が保持される。残余の液は、系外に排出する。

ついで、上記の主要な成分が保持された濃縮カラム16に、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16に送液する。このときの流速は $800\mu\text{l}/\text{min}$ であり、ポンプ吐出圧は 10.1MPa である。

5 なお、これらの操作は、前記したように切り換え機構14を介して行われる。

ここで、試料注入器28としてオートサンプラーを用いて、 4°C の温度に保持された分析試料を連続的に自動処理するときは、分離カラム18以降のカラムには、濃縮された分析試料を送らない間、切り換え機構14を介して第2系列の移動相を常時送液しておく、より好適である。このときの流速は $800\mu\text{l}/\text{min}$ であり、ポンプ吐出圧は 7.6MPa である。

これにより、主要な成分が濃縮された分析試料を同伴した液が、分離カラム18、還元カラム20に順次送液され、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を主体（分析対象成分）とする分析試料中の主要な成分の分離が行われ、さらに、コエンザイムQ-10を主とする被還元性成分が還元される。

15 還元カラム20で処理された液は、電気化学検出器22および紫外吸収検出器24に順次送られ、検出処理される。

電気化学検出器22により得られる、検体としてヒトの血漿を用いたクロマトグラムの一例を図7に示す。電気化学検出器22の設定加電圧は 600mV である。図7中矢印1aがコエンザイムQ-10の2電子還元体（ユビキノール）のピークを示し、矢印2aがコエンザイムQ-10（ユビキノン）のピークを示す。

20 続いて、第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法における前処理について説明する。前記した第1の形態例とは、検体が異なる（第1の形態例ではヒトの血漿）だけであるため、第1の形態例の説明と同様に図4を用いて説明する。

25 まず、検体としてのヒトの唾液を $40\mu\text{l}$ 採取し（図4中、S-1）、これにイソプロピルアルコールを $950\mu\text{l}$ 加え（図4中、S-2）、十分に混合させる。ついで、 4°C の温度下、 12000rpm の回転速度で3分間、遠心機にかける。これにより、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体がイソプロピルアルコール相に抽出される（図4中S-3）。

そして、コエンザイムQ-10等を抽出した抽出液は、4℃前後の温度で保管される（図4中、S-4）。本第2の形態例においても、第1の形態例と同様に、保管中の分析試料の変質を防止することができる。よって、本実施に係る第2の形態例によっても、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を抽出した分析試料を長時間安定した状態で保管することができる。そして、この抽出液を分析試料とすることで、正確に分析することができる。なお、他の条件等については、先に説明した第1の形態例と同一であるため、その説明は省略する。

つぎに、上記の前処理を施し、所要時間保管した抽出液を分析試料として、HPLCで分析する方法について以下説明する。本実施に係る第2の形態例における分析方法も、基本的には前記した第1の形態例における分析方法と同一である。このため、第2の形態例における分析方法については簡略的に説明するものとする。なお、分析に使用するHPLC及び分析システムは、先に図6を用いて説明したものをそのまま使用するため、HPLC及び分析システムの説明は省略するものとする。

前記した前処理後の抽出液を分析試料として40μl用意する。この40μlの分析試料中には、2.0μlのヒトの唾液が含まれる。

まず、切り換え機構14をモードA2にして、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16、分離カラム18および還元カラム20の各カラムに流して、各カラムを安定化させる。この際、濃縮カラム16としては直径2.0mm×長さ35mmであるCapcel Pack C18 AQ S5（商品名）を用いることができる。また、分離カラム18としては直径2.0mm×長さ250mmであるCapcel Pack C18 AQ S5（商品名）を用いることができる。さらに、還元カラム20としては直径2.0mm×長さ20mmであるSHISEIDO CQ（商品名）を用いることができる。

ついで、貯留容器25aに貯留した第1系列の移動相（メタノール95%水溶液）をポンプ26aで、途中で試料注入器28によって上記の分析試料を同伴させて濃縮カラム16に送液する。この時の流速は、例えば200μl/minである。濃縮カラム16では分析試料中のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体等の主要な成分が保持される。残余の液は、系外に排出する。

ついで、上記の主要な成分が保持された濃縮カラム16に、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16に送液する。

ここで、試料注入器28としてオートサンプラーを用いて、4℃の温度に保持された分析試料を連続的に分離カラム18に供給する。これにより、主要な成分が濃縮された分析試料を同伴した液が、分離カラム18、還元カラム20に順次送液され、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を主体（分析対象成分）とする分析試料中の主要な成分の分離が行われ、さらに、コエンザイムQ-10を主とする被還元性成分が還元される。この時の流速は、例えば400 μ l/minである。還元カラム20で処理された液は、電気化学検出器22および紫外吸収検出器24に順次送られ、検出処理される。

電気化学検出器22により得られる、検体としてヒトの唾液を用いたクロマトグラムの一例を図8に示す。図8中、矢印3aがコエンザイムQ-10のピークを示している。

以上説明した第1及び第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムによれば、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を抽出した抽出液を分析試料とし、この分析試料を濃縮したものを分析するため、高感度で正確に分析することができる。

また、第1及び第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムによれば、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を同時分析し、また、好ましくは大量の検体を連続的かつ自動的に処理するため、能率的に分析することができる。

さらに、第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムによれば、検体として唾液を用いてる。唾液の採取は血液（血漿）の採取と異なり非侵襲であるため、自己採取可能であり、体内におけるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の量を容易に検出することが可能となる。

上記したように、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法によれば、前処理としてコエンザイムQ-10およびその2電子還元

体の少なくともいずれかひとつを含む検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析するため、正確に分析することができる。また、検体を採取した後に直ちに分析を行う必要がない。

- また、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法
- 5 によれば、分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うため、分析試料のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の濃度が低い場合においても正確にかつ高感度で分析することができる。

- また、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法
- 10 によれば、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出するため、能率的に分析することができる。

- また、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムによれば、分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動
- 15 相のみを送液する第2系列とからなる送液機構と、送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、第1系列の移動相を受け入れて分析試料を濃縮した後、第2の移動相を受け入れる濃縮カラムと、濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、還元カラムから送り出された液を検出処
- 20 理する電気化学検出器とを有するため、好適に本発明の分析方法を実現することができる。

請求の範囲

1. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

5 前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともい
ずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として
分析することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析
方法。

10 2. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともい
 ずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で
 抽出し、抽出液を分析試料として分析することを特徴とするコエンザイムQ-1
 0およびその2電子還元体の分析方法。

3. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

20 前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともい
ずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として
分析し、

かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度で保管しておくことを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

25

4. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で

抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度で保管しておくことを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

5

5. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

10

かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うことを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

6. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

15

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うことを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

20

7. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

25

かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度で保管しておく、

かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うこ

とを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

8. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

- 5 前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度で保管しておく、

- 10 かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うことを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

9. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

- 15 前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

- かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を
20 カラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

10. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

- 25 前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を

カラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とする
コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

11. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量
5 する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともい
ずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として
分析し、

- かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の
10 範囲内の温度で保管しておく、

かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体か
らの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を
カラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とする
コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

15

12. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量
する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともい
ずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で
20 抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の
範囲内の温度で保管しておく、

- かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体か
らの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を
25 カラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とする
コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

13. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量
する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行い、

- 5 かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

- 10 14. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析し、

- 15 かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行い、
かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

20

15. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として

- 25 分析し、

かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度で保管しておき、

かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行い、

かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体か

らの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

- 5 16. 検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、
前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともい
ずれかひとつを含む該検体をイソプロピルアルコールよりなる水溶性有機溶媒で
抽出し、抽出液を分析試料として分析し、
10 かつ、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の
範囲内の温度で保管しておく、
かつ、前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行い、
かつ、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体か
らの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を
15 カラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とする
コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

17. コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法に用いる分
析システムであって、
20 分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動相のみを送液
する第2系列とからなる送液機構と、
該送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、
該第1系列の移動相を受け入れて該分析試料を濃縮した後、該第2の移動相を
受け入れる濃縮カラムと、
25 該濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、
該分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、
該還元カラムから送り出された液を検出処理する電気化学検出器とを有するこ
とを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システム。

18. コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法に用いる分析システムであって、

分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動相のみを送液する第2系列とからなる送液機構と、

- 5 該送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、
該第1系列の移動相を受け入れて該分析試料を濃縮した後、該第2の移動相を受け入れる濃縮カラムと、

該濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、

該分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、

- 10 該還元カラムから送り出された液を検出処理する電気化学検出器とを有し、
検出器としてさらに紫外吸収検出器を有することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システム。

FIG.1

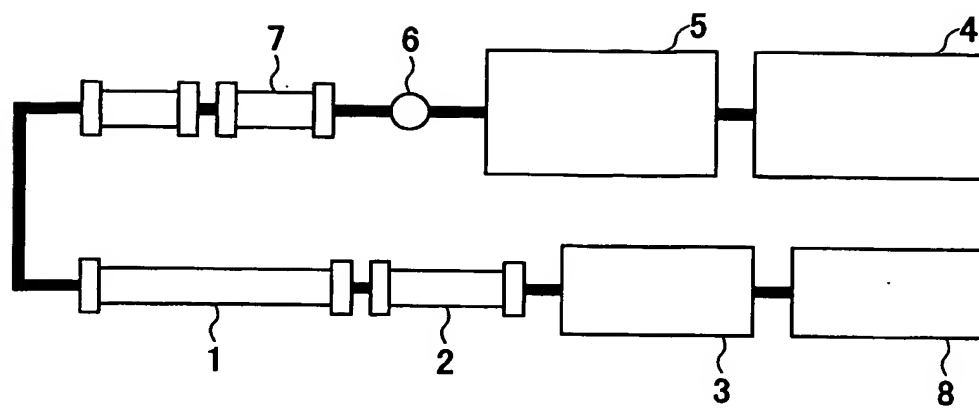
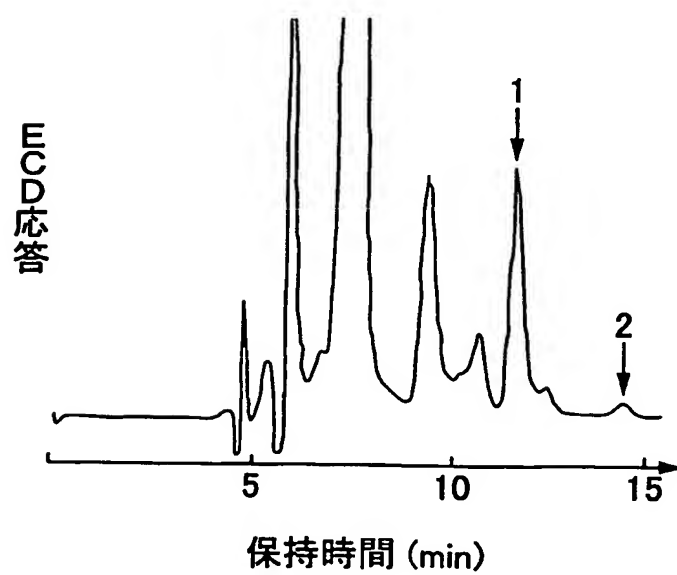


FIG.2



2/7

FIG.3A

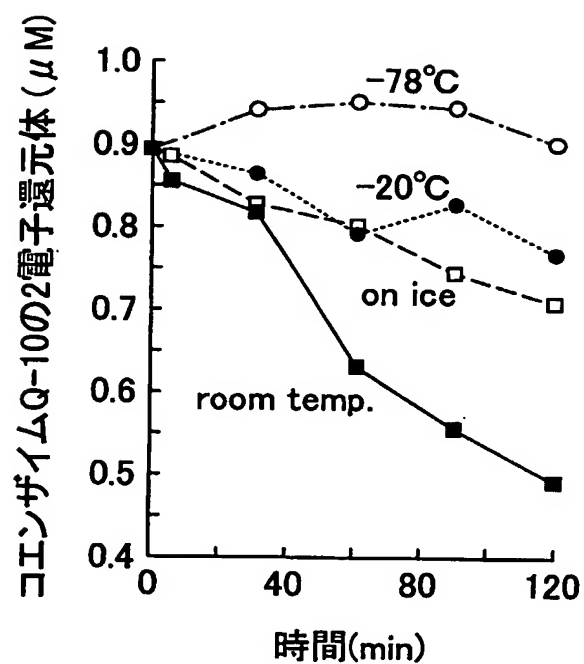


FIG.3B

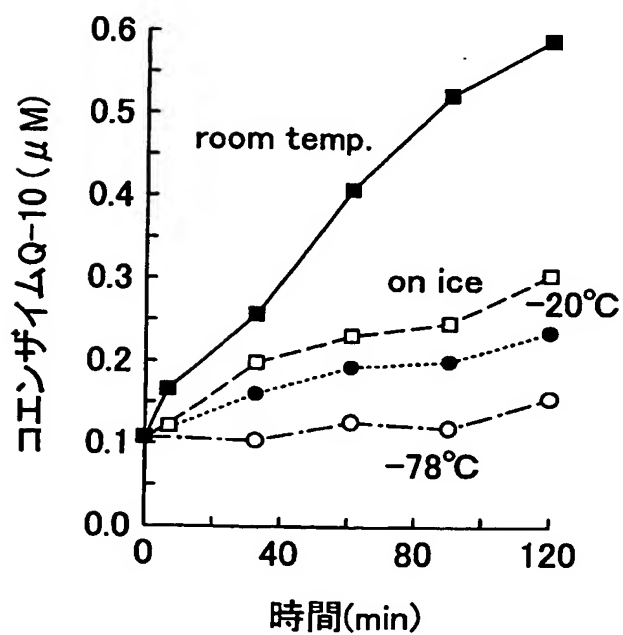
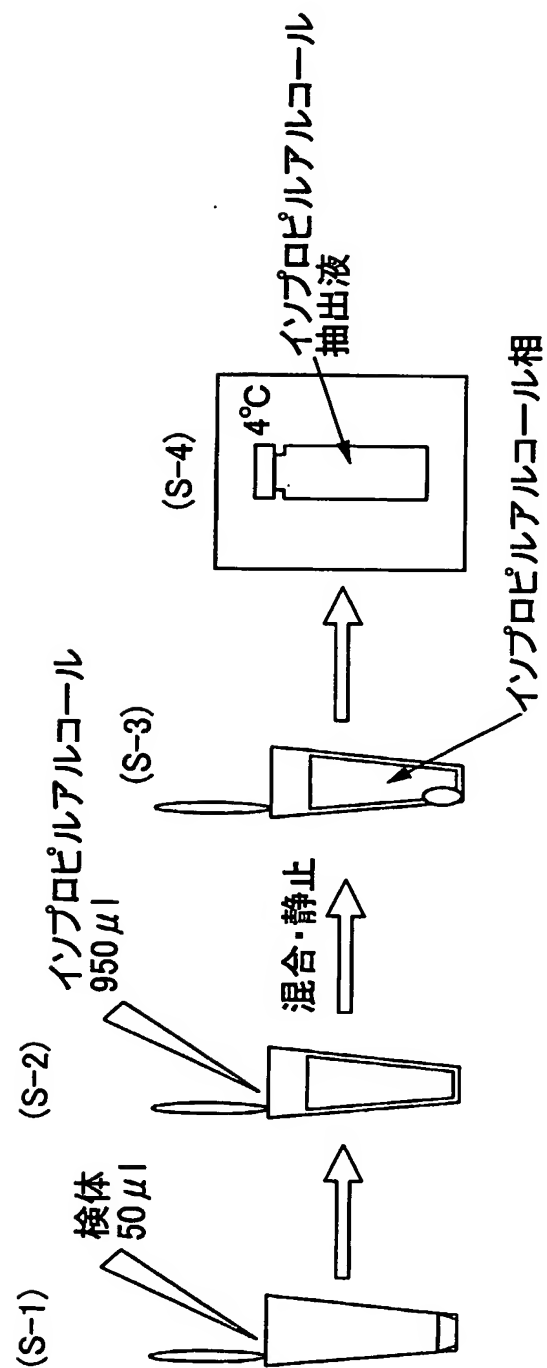


FIG.4



4/7

FIG.5A

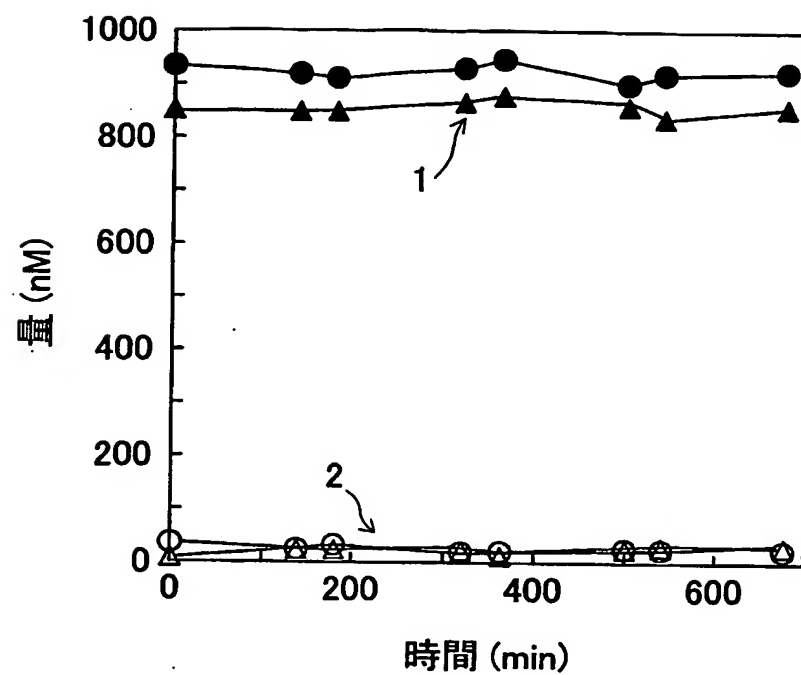


FIG.5B

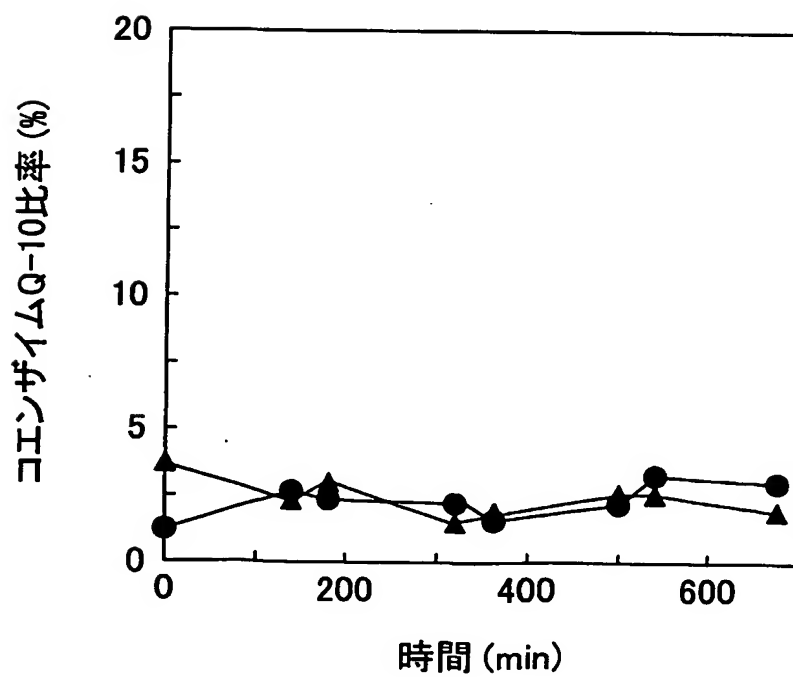


FIG.6

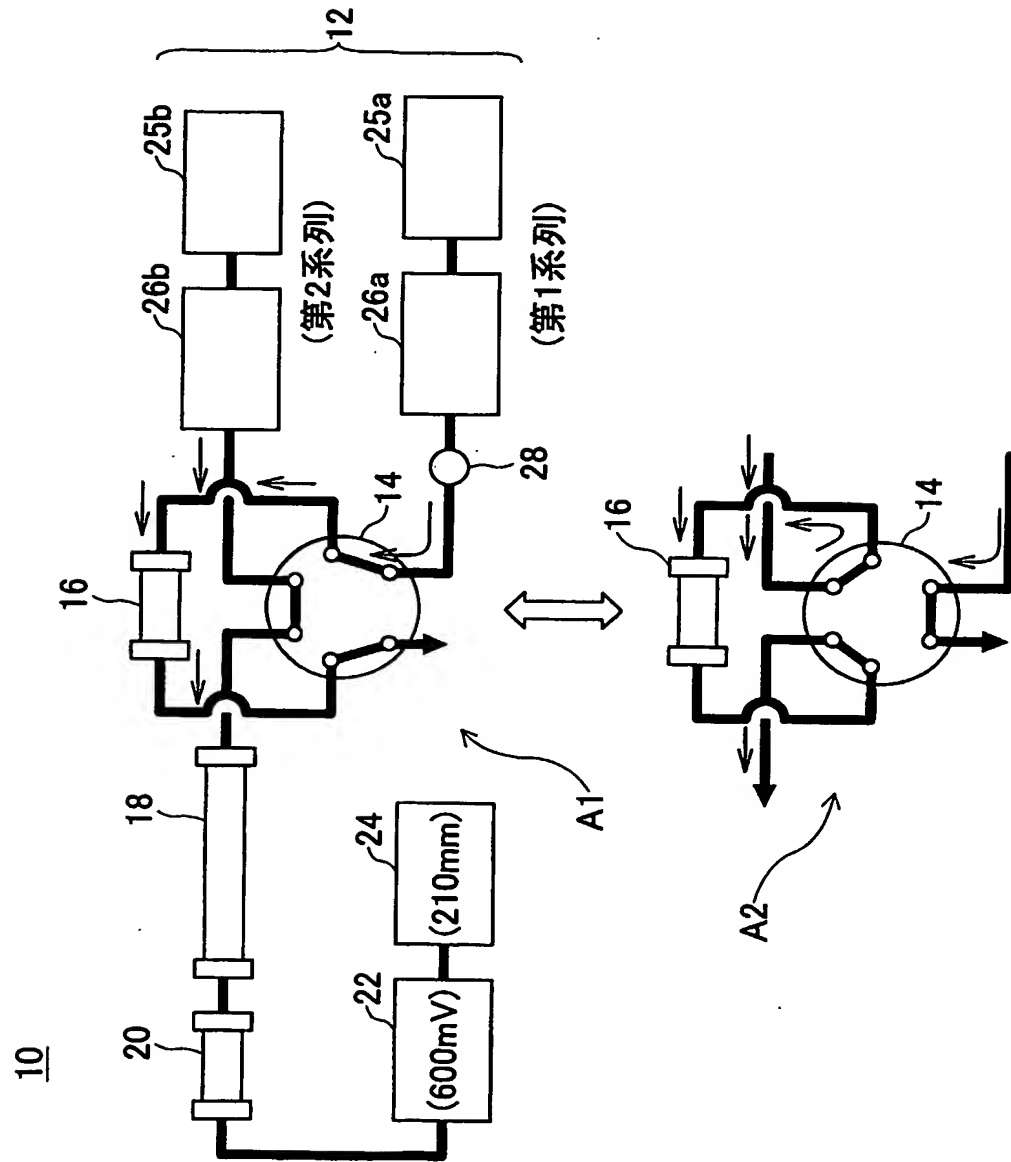


FIG.7

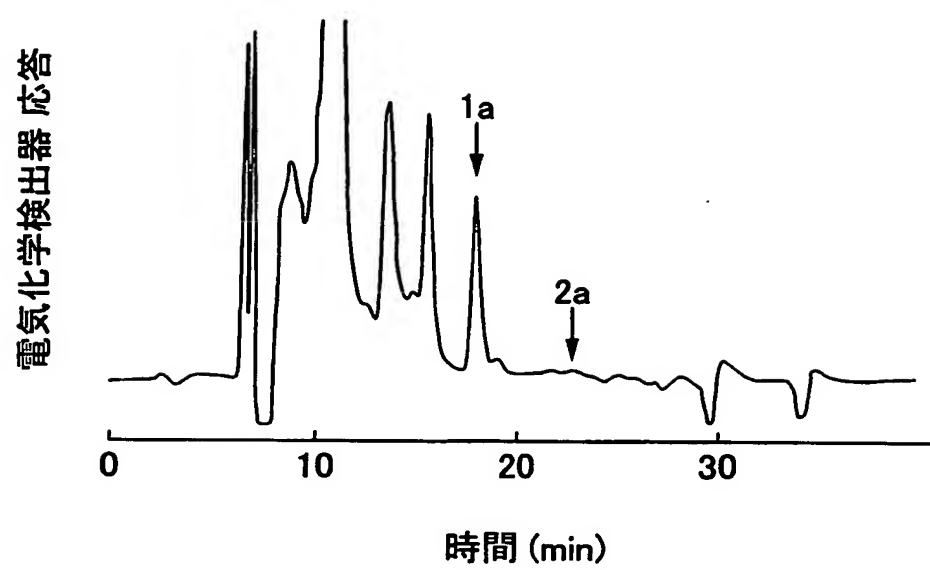
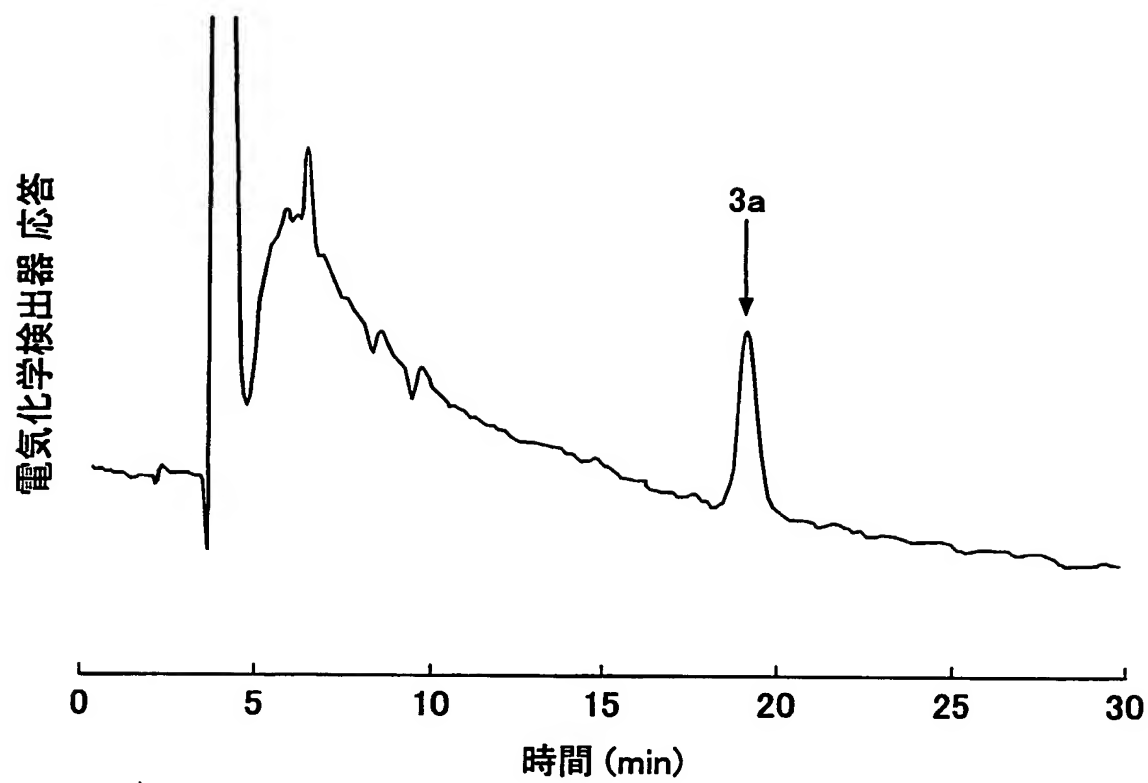


FIG.8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N30/88, G01N30/06, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/84,
G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N30/88, G01N30/06, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/84,
G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	EDLUND, "DETERMINATION OF COENZYME Q10, α -TOCOPHEROL AND CHOLESTEROL IN BIOLOGICAL SAMPLES BY COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH COULOMETRIC AND ULTRAVIOLET DETECTION", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 425(1988), pages 87 to 97	1-8/9-18
Y	YAMASHITA, "SIMULTANEOUS DETECTION OF UBIQUINOL AND UBIQUINONE IN HUMAN PLASMA AS A MARKER OF OXIDATIVE STRESS", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 250(1997), pages 66 to 73	9-18
A	WO 03/56024 A (Kaneka Corp.), 10 July, 2003 (10.07.03), (Family: none)	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 January, 2004 (21.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15478

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 55-39701 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 March, 1980 (19.03.80), (Family: none)	1-18
A	JP 58-92609 A (Fujimoto Seiyaku Kabushiki Kaisha), 02 June, 1983 (02.06.83), (Family: none)	1-18
A	JP 61-293391 A (Kabushiki Kaisha Sanko Seisakusho), 24 December, 1986 (24.12.86), (Family: none)	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15478

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

The special technical feature of claim 1 relates to "a method of analyzing CoQ-10 and its two-electron reduction product wherein CoQ-10 is extracted with a water-soluble organic solvent in the step of extraction", while the special technical feature of claims 17 and 18 resides in "a system for analyzing CoQ-10 and its two-electron reduction product having a liquid-transfer unit, a concentration column, a separation column, a reduction column and an electrochemical detector". Since there is no technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N30/88, G01N30/06, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/84, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N30/88, G01N30/06, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/84, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	EDLUND, "DETERMINATION OF COENZYME Q10, α -TOCOPHEROL AND CHOLESTEROL IN BIOLOGICAL SAMPLES BY COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH COULOMETRIC AND ULTRAVIOLET DETECTION" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 425 (1988) P. 87-97	1-8/9-18
Y	YAMASHITA, "SIMULTANEOUS DETECTION OF UBIQUINOL AND UBIQUINONE IN HUMAN PLASMA AS A MARKER OF OXIDATIVE STRESS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 250 (1997) P. 66-73	9-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.01.04

国際調査報告の発送日

10.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2 J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 03/56024 A (鐘淵化学工業株式会社) 2003. 07. 10 (ファミリーなし)	1-18
A	J P 55-39701 A (協和醗酵工業株式会社) 1980. 03. 19 (ファミリーなし)	1-18
A	J P 58-92609 A (藤本製薬株式会社) 1983. 06. 02 (ファミリーなし)	1-18
A	J P 61-293391 A (株式会社三興製作所) 1986. 12. 24 (ファミリーなし)	1-18

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページを参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1の特別な技術的特徴は「C o Q-10を抽出する際に水溶性有機溶媒で抽出するC o Q-10及びその2電子還元体の分析方法」に関し、請求の範囲17, 18の特別な技術的特徴は「送液機構、濃縮カラム、分離カラム、還元カラム、電気化学検出器を有するC o Q-10及びその2電子還元体の分析システム」に関するものである。これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。